

海洋弧菌 NTi 产琼胶酶的发酵条件优化

邵 媛¹, 姚德恒¹, 洪清林², 嵇海峰², 姜泽东^{1,3}, 倪 辉^{1,3}, 肖安风^{1,3,4}

(1. 集美大学食品与生物工程学院, 福建 厦门 361021; 2. 福建省海藻多糖企业工程技术研究中心, 福建 漳州 363100; 3. 福建省海洋功能食品工程技术研究中心, 福建 厦门 361021; 4. 厦门市海洋功能食品重点实验室, 福建 厦门 361021)

[摘要] 以琼胶酶活力为主要指标, 采用单因素与响应面相结合的方法, 对降解琼胶的海洋弧菌 NTi (*Vibrio natriegens* NTi) 发酵产琼胶酶的摇瓶发酵培养基和发酵条件进行优化。结果表明, α -乳糖对菌株产酶具有较强的抑制作用, NH_4^+ 不利于菌株生长和产酶。培养基分别以 3.3 g/L 琼脂、6.33 g/L 酵母膏为唯一碳源及氮源, 添加 20 g/L 的 NaCl, 发酵海洋弧菌 *V. natriegens* NTi 产琼胶酶的效果最佳。发酵过程中的 pH 值、接种量、装液量、温度、发酵时间最优值分别为 6.5、2%、32 mL、27 °C 和 24 h。优化后, 该菌产琼胶酶活力达到 2.81 U/mL, 比优化前增加了 230%。

[关键词] 琼胶酶; 海洋弧菌 NTi; 摇瓶发酵; 工艺优化; 响应面试验

[中图分类号] Q 814

Process Optimization of Agarases Fermentation by *Vibrio natriegens* NTi

SHAO Yuan¹, YAO Deheng¹, HONG Qinglin², JI Haifeng², JIANG Zedong^{1,3}, NI Hui^{1,3}, XIAO Anfeng^{1,3,4}

(1. College of Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China;

2. Algal Polysaccharide Enterprise Engineering Technology Research Center in Fujian Province, Zhangzhou 363100, China;

3. Fujian Provincial Engineering Technology Research Center of Marine Functional Food, Xiamen 361021, China;

4. Xiamen Key Laboratory of Marine Functional Food, Xiamen 361021, China)

Abstract: The single factor test and response surface methodology were used to optimize the fermentation medium and fermentation conditions of agarase produced by marine *Vibrio natriegens* NTi, and the agarase activity was taken as main indicator. The results showed that α -lactose had a significant inhibitory effect on the agarase production, while ammonium ion was not conducive to cell growth and enzyme production. The optimal composition of culture medium for agarase-producing was: 3.3 g/L agar as the sole carbon source, 6.33 g/L yeast extract as the sole nitrogen source and 20 g/L NaCl. Meanwhile, the optimum conditions for agarase production were pH = 6.5, inoculation amount 2%, liquid volume 32 mL, temperature 27 °C and fermentation time 24 h, respectively. Under the optimum conditions, agarase activity reached 2.81 U/mL after 24 h of fermentation and increased by 230% compared with the activity under the initial medium and conditions.

Keywords: agarase; *Vibrio natriegens* NTi; shaking flask fermentation; process optimization; response surface methodology

[收稿日期] 2018-03-01

[基金项目] 福建省高校产学研合作项目 (2016N5008); 福建省科技重大专项项目 (2015NZ0001-1); 国家海洋公益行业科研专项 (201505033); 福建省海洋高新技术产业发展专项 (闽海洋高新 [2016] 08 号)

[作者简介] 邵媛 (1996—), 女, 硕士生, 从事食品生物技术方向研究。通信作者: 肖安风 (1973—), 男, 教授, 博士, 从事食品生物技术方向研究。E-mail: xxaaffeng@jmu.edu.cn

0 引言

琼胶,也称琼脂,是一种具有高凝胶强度的细胞间黏多糖。琼胶酶能催化水解琼胶生成琼胶寡糖,琼胶酶水解琼胶生成的琼胶寡糖具有抗氧化、减缓淀粉水解、促进人体吸收等特性,被广泛用于食品、化妆品及制药工业等领域^[1-2]。此外,琼胶酶也是生物研究领域的重要工具酶^[3-6],可用于分离制备海藻原生质体^[7],从而从海藻中提取不饱和脂肪酸、维生素、类胡萝卜素及甜菜碱等生物活性物质^[8]。因此,研究产琼胶酶菌株及琼胶酶的开发利用具有重要意义。

优化发酵培养基组成及发酵条件是提高琼胶酶发酵产量、降低成本、减少发酵时间的重要手段之一。付晓婷^[9]从蛸螺 (*Turbinidae batillus cornutus*) 肠道中分离到了菌株 *Agarivorans albus* YKW-34,并对其发酵条件进行了优化,利用单因素、Plackett-Burman 实验筛选出了对菌株产酶具有显著影响的3个因素,并进一步利用响应面法确定了其最佳条件,在最佳条件下培养 12 h 后,酶活力达到 0.87 U/mL。吴国汉^[10]从厦门近海海水及江蓠表面分离筛选得到 10 余株琼胶降解菌,并对其中的高产琼胶酶菌株 (QM1) 进行了发酵条件优化,确定最佳条件为:温度 28 ℃、初始 pH = 7.5、琼脂 2 g/L、NaCl 20 g/L、发酵时间 36 h,在最佳条件下酶活力达到 3.4 U/mL。Jung 等^[11]通过单因素、Plackett-Burman 实验设计确定了 *Pseudoaltermonas* sp. JYBCL 1 菌株产 β -琼胶酶的最佳培养基组成与发酵条件。

目前,大多数琼胶酶均来自海洋细菌,受海洋中复杂的生长环境的影响较大,这些菌株产酶能力较低,酶活性不稳定,在很大程度上限制了琼胶酶的生产^[12]。因此,对琼胶酶的发酵工艺进行优化,获得高产的琼胶酶具有重要意义。本文筛选得到一株高产琼胶酶的海洋弧菌 NTi,并对其进行摇瓶发酵优化,通过单因素方法考察培养基成分及发酵条件对海洋弧菌 NTi 发酵过程中琼胶酶活力及生物量的影响,并用 SPSS 19.0 对单因素实验数据进行方差分析,选出对产酶量有显著影响的关键因子,最后利用响应面试验确定关键因子的最优水平来提高琼胶酶产量。

1 材料与方法

1.1 菌种及培养基

海洋弧菌 *Vibrio natriegens* NTi 菌株筛选自厦门红树林土壤,保藏于中国工业微生物菌种保藏管理中心,保藏编号为 CICC 23820。

斜面培养基 (g/L): 琼脂 20, 蛋白胨 5, 酵母膏 1, NaCl 30, MgSO₄ · 7H₂O 5, KCl 1, CaCl₂ 0.2, K₂HPO₄ 0.1, FeSO₄ · 7H₂O 0.02, pH = 7.5, 121 ℃ 灭菌 20 min。

种子培养基 (g/L): 蛋白胨 5, 酵母膏 1, NaCl 30, MgSO₄ · 7H₂O 5, KCl 1, CaCl₂ 0.2, K₂HPO₄ 0.1, FeSO₄ · 7H₂O 0.02, pH = 7.5, 121 ℃ 灭菌 20 min。

摇瓶初始发酵培养基 (g/L): 琼脂 2, NaNO₃ 5, NaCl 30, MgSO₄ · 7H₂O 5, KCl 1, CaCl₂ 0.2, K₂HPO₄ 0.1, FeSO₄ · 7H₂O 0.02, pH = 7.5, 121 ℃ 灭菌 20 min。

1.2 琼胶酶活力的测定

采用 DNS 法测酶活力^[13]: 取 1.0 mL 发酵液, 12 000 r/min 离心 10 min, 取 0.3 mL 上清液稀释 4 倍 (用 pH = 7.0 的 50 mmol/L NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ 缓冲液稀释)。取 50 μ L 稀释液, 加入 350 μ L 的琼脂溶液 (5 g/L, 溶于 pH = 7.0 的 50 mmol/L NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ 缓冲液, 高温溶解后保温于 40 ℃ 水浴中), 40 ℃ 反应 20 min, 加 0.6 mL DNS 溶液终止反应, 沸水浴 5 min 后冷却, 稀释至 5 mL, 测 A₅₄₀, 然后依据葡萄糖标准曲线来计算反应液中还原糖的生成量。以沸水浴灭活 5 min 的酶液作为对照。酶活力单位定义为: 上述条件下 1 min 催化产生 1 μ mol 还原糖所需的酶量为一个酶活力单位 (U)。

1.3 生长曲线及产酶曲线的测定

将经过活化的菌种接入种子培养基, 之后按接种量 2% 接入初始发酵培养基中, 25 ℃、180 r/min 条件下培养, 每 4 h 取样测定生物量 (均匀吸取 1.0 mL 发酵液, 12 000 r/min 离心 10 min, 去掉上清液后

用蒸馏水梯度稀释至 6 倍，以蒸馏水作空白，测 A_{600} ）及酶活力。分别绘制生长曲线及产酶曲线。

1.4 单因素实验设计

1.4.1 发酵培养基的确定

从基础发酵培养基出发，依次用不同碳源（琼脂、海藻酸钠、卡拉胶、葡萄糖、 α -乳糖、可溶性淀粉、麦芽糖），不同氮源（ KNO_3 、 $NaNO_3$ 、 NH_4Cl 、 $(NH_4)_2SO_4$ 、蛋白胨、酵母膏、豆饼粉、玉米浆）替代基础培养基中的对应条件，并且对碳源、氮源以及 $NaCl$ 浓度进行优化，发酵条件为：接种量 2%，装液量 50 mL，25℃，180 r/min，发酵 24 h。

1.4.2 发酵条件的确定

采用优化后的培养基，当培养基初始接种量为 2%、装液量为 50 mL、温度为 25℃时，考察不同 pH 值（5.0,5.5,6.0,6.5,7.0,7.5,8.0,8.5,9.0）对菌株 NTi 产琼胶酶的影响。

当培养基 pH=6.5，装液量为 50 mL、温度为 25℃时，考察不同接种量（0.01%,0.05%,0.1%,0.5%,1%,2%,5%,10%）对菌株 NTi 产琼胶酶的影响。

当 pH=6.5、接种量为 2%、温度为 25℃时，考察不同装液量（10,30,50,70,90,110 mL）对菌株 NTi 产琼胶酶的影响。

当 pH=6.5、接种量为 2%、装液量为 30 mL 时，考察不同发酵温度（20,25,30,35,40℃）对弧菌 NTi 产琼胶酶的影响，发酵时间 24 h。

1.5 琼胶酶发酵工艺条件优化

参照单因素实验结果，用 SPSS 19.0 对单因素实验数据进行方差分析^[14]。将定性因素发酵时间 24 h、碳源种类琼脂、氮源种类酵母膏和影响较小的因素 $NaCl$ 浓度（ $P=0.053$ ）、培养基初始 pH 值（ $P=0.051$ ）、接种量（ $P=0.174$ ）作为常量，选出显著影响的变量因素琼脂浓度（ $P=0.011$ ）、酵母膏浓度（ $P=0.002$ ）、装液量（ $P=0.002$ ）、发酵温度（ $P<0.0001$ ）用于响应面设计。采用四因素三水平的响应面分析方法，以琼胶酶活力为响应值设计响应面。

根据 Box-Behnken 的中心组合实验设计^[15]，对显著影响因子进行优化并构建模型，该模型通过最小二乘法拟合的二次多项方程为： $Y = b_0 + \sum (b_i x_i) + \sum (b_{ij} x_i x_j) + \sum (b_{ii} x_i^2)$ ，式中： Y 是被预测的响应值； b_0 是常数； b_i 是线性系数； b_{ij} 是交互项系数； b_{ii} 是二次项系数。根据相关的单因素结果选取因素水平设计实验，实验因素与水平设计见表 1。

1.6 数据处理

实验所得数据为 3 次重复试验的平均值，通过 Design-Expert 8.0 对数据进行响应面分析。

2 结果与分析

2.1 菌株生长及产酶曲线的绘制

将活化后的菌种按接种量 2% 接入初始发酵培养基中，在 25℃、180 r/min 条件下连续培养 64 h，每隔 4 h 测定菌株的生物量及酶活力，结果见图 1。由图 1 可以看出，菌体接入种子培养基 4 h 以后进入对数生长期，菌体大量繁殖；12 h 后生长变慢，进入稳定期；16 h 后生物量下降，直到 24 h 后，菌体开始自溶，至 36 h 菌体出现衰亡。酶活力和生物量不呈正相关，琼胶酶活力在 32 h 达到最高。

表 1 BBD 实验设计因子及水平表
Tab.1 Factors and level of response surface Box-Bohnkon design

因素 Factors	水平 Level		
	低 Low (-1)	中 Medium (0)	高 High (+1)
琼脂 Agar/(g·L ⁻¹)(A)	2	3	4
酵母膏 Yeast extract/(g·L ⁻¹)(B)	4	6	8
装液量 Liquid volume/mL(C)	10	30	50
温度 Temperature/℃(D)	20	25	30

其中 24 ~ 32 h 菌体自溶后,菌体细胞中可能存在的胞内酶进入到发酵液中,导致发酵液酶活力升高。32 h 后,酶活力开始下降。综上,将 24 h 确定为琼胶酶摇瓶发酵的时间。

2.2 接种种龄的确定

种子液的培养质量是影响发酵结果的一个重要因素,如果接入的种子液不成熟,就会导致生物量偏低,发酵延滞期延长,从而使菌体生长缓慢推迟产物合成时间;如果种子培养时间过长,虽然生物量很大,但存在菌体过早衰退导致生产能力下降等问题^[16]。为了考察接种种龄对产酶的影响,分别取种龄为 6 h (对数生长前期)、12 h (对数生长中期)、24 h (稳定末期)和 48 h (衰亡期)的种子接种培养,结果如图 2 所示。由图 2 可见,以种龄为 12 h 的种子接种时,琼胶酶活力最高,种龄在 12 h 之后,随着种龄的增加,接种后的菌体生长及酶产量均下降。Wang 等^[17]认为,处于稳定期后期的种子液因为自身含有较多的代谢产物,该时期的菌种接种时可能会抑制酶的合成。因此,本研究后续实验中以种龄为 12 h 的种子液进行接种。

2.3 发酵培养基的单因素优化

2.3.1 碳源种类及浓度对琼胶酶产量的影响

按照等质量浓度的原则,在发酵培养基中分别添加 2 g/L 不同碳源 (琼脂、海藻酸钠、卡拉胶、葡萄糖、 α -乳糖、可溶性淀粉、麦芽糖),以无碳源添加为对照组,考察碳源种类和浓度对琼胶酶产量的影响,结果如图 3 所示。由图 3a 可以看出,培养基中无碳源和添加 α -乳糖作为唯一碳源时,菌体生物量及琼胶酶活力非常低;当以琼脂作为唯一碳源时,菌体生物量比较高,琼胶酶活力最高达到 0.85 U/mL;除琼脂外,其他碳源也可诱导其产琼胶酶,但活力较低。说明该菌产生的琼胶酶为非诱导型酶,琼脂是弧菌 NTi 发酵产琼胶酶的最适碳源。

付晓婷^[9]报道,琼脂与多糖混合作为碳源时,琼胶酶的活力降低了 10%,额外添加单糖时琼胶酶活力明显降低 50%。为进一步考察碳源对弧菌 NTi 发酵产琼胶酶的影响,在以琼脂为诱导碳源的基础上,额外添加 1 g/L 不同碳源 (海藻酸钠、卡拉胶、葡萄糖、 α -乳糖、可溶性淀粉、麦芽糖)的结果见图 3b。由图 3b 可以看出,当以琼脂作为唯一碳源时,酶活力最高达到 0.83 U/mL,额外添加不同种类碳源对琼胶酶产量都有不同程度的抑制;当额外添加可溶性淀粉和葡萄糖时,菌体生物量最高,但酶活力低于以琼脂作为唯一碳源时; α -乳糖与琼脂混合添加时几乎检测不到酶活力。结合图 3a 发现, α -乳糖为单一碳源时菌体生长及产酶均受到抑制,说明 α -乳糖对菌株产酶具有较强的抑制作用。所以本研究选定琼脂作为唯一碳源。

继而,以摇瓶发酵培养基为基础,考察不同琼脂浓度对海洋弧菌 NTi 生长及琼胶酶产量的影响,得出最适添加量为 3 g/L (见图 3c),并以此作为海洋弧菌 NTi 发酵产琼胶酶的初始碳源。

2.3.2 氮源种类及浓度对琼胶酶产量的影响

以 3 g/L 琼脂为碳源,在此基础上考察添加 5 g/L 不同氮源 (KNO_3 、 $NaNO_3$ 、 NH_4Cl 、 $(NH_4)_2SO_4$ 、蛋白胨、酵母膏、豆饼粉、玉米浆)对海洋弧菌 NTi 生长及琼胶酶产量的影响,以不添加氮源为对照组,

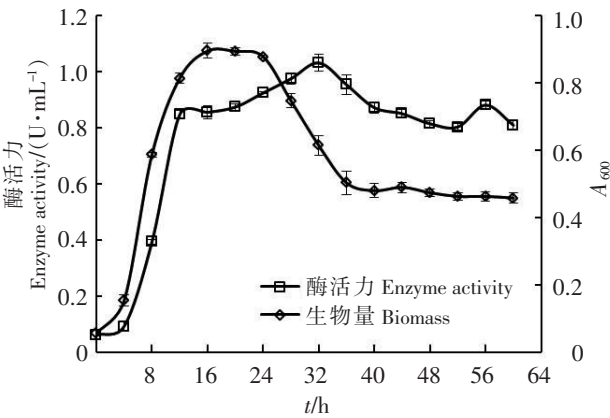


图 1 海洋弧菌 NTi 的发酵曲线

Fig.1 Fermentation process curve of *Vibrio natriegens* NTi

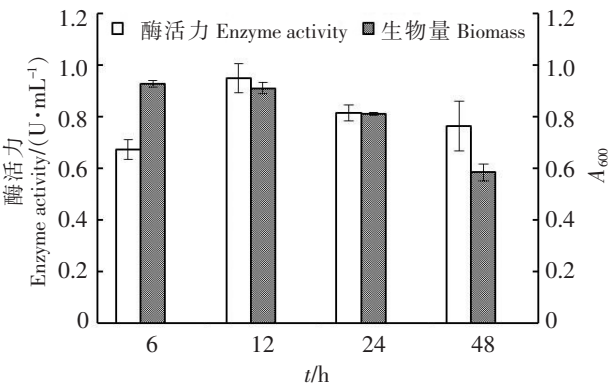


图 2 种龄对海洋弧菌 NTi 生长及琼胶酶产量的影响

Fig.2 Effects of inoculum ages on cell growth and agarases production of *Vibrio natriegens* NTi

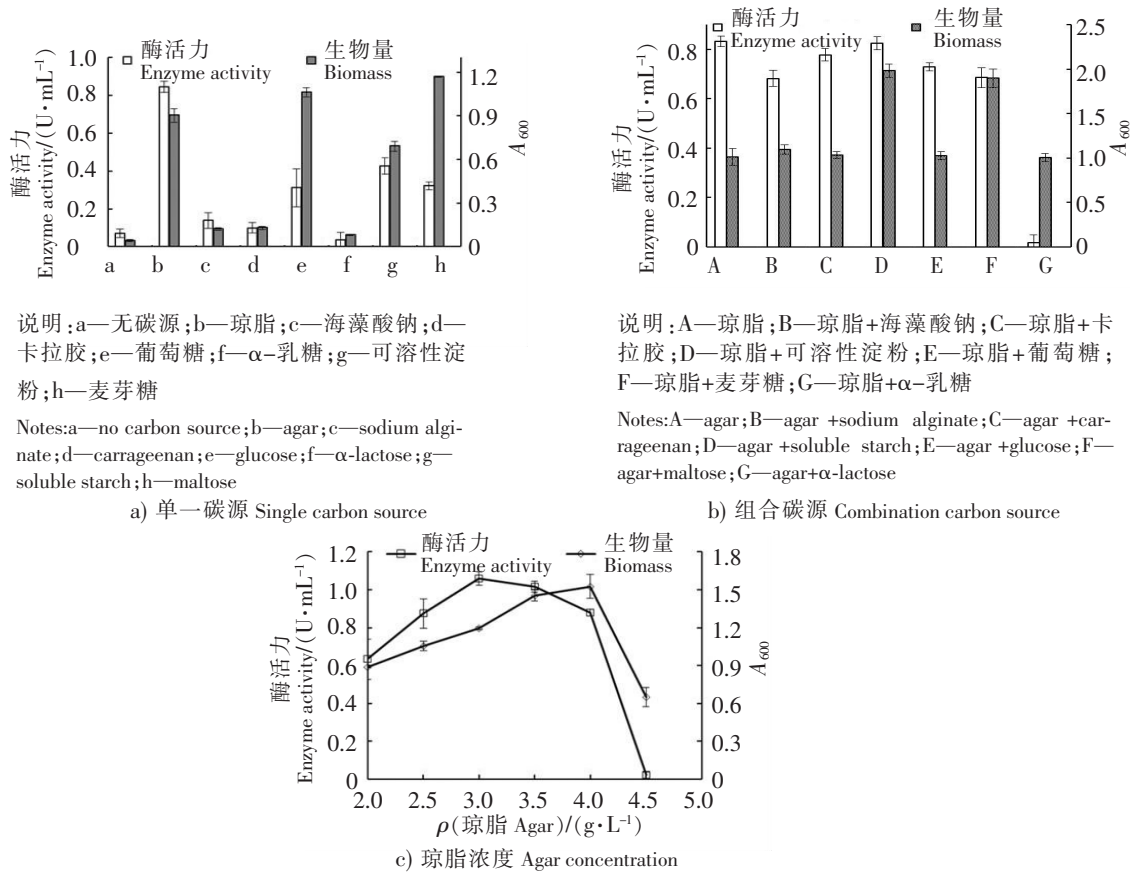


图 3 不同碳源种类及琼脂浓度对海洋弧菌 NTi 生长及琼胶酶产量的影响

Fig.3 Effects of different carbon sources and agar concentration on cell growth and agarases production of *Vibrio natriegens* NTi

考察氮源种类和浓度对琼胶酶产量的影响，结果如图 4 所示。从图 4a 可以看出，以 NH_4Cl 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为氮源时，菌体生物量及琼胶酶活力均比较低。张炎达等^[18]研究 NH_4^+ 对 3 种细菌合成气乙醇发酵过程的影响时发现，当 NH_4^+ 浓度高于 9.35 mmol/L 时，菌体生长随其浓度的增大而抑制显著，说明 NH_4^+ 对某些细菌的生长是有抑制作用的。王静雪等^[19]报道，柠檬酸三铵是海洋弧菌 QJH-12 产琼胶酶的最佳氮源，微生物菌种的来源不同，利于产酶的最适氮源也有所不同；氮源为有机氮源时菌体生物量升高，琼胶酶活力也高于其他试验组，其中以酵母膏为氮源时酶活力最高，达到 1.71 U/mL。

由于不同有机氮源所含的氮量和生长因子差异较大，所以设计酵母膏、玉米浆及 NaNO_3 总浓度为 5 g/L，分别考察三者不同比例对琼胶酶发酵的影响，以添加酵母膏、玉米浆及 NaNO_3 为对照组。由图 4b 可以看出，培养基中以酵母膏作为唯一氮源时，菌体生物量达到最大，琼胶酶活力最高达到 2.28 U/mL。随着酵母膏与玉米浆两者比例不断升高，菌体生物量与产酶量有较明显的提高。相反，在无机氮源所占比例升高时，琼胶酶活力低于对照组。由此可见，组合氮源产酶效果并不比单一添加酵母膏的高。因此，在后续试验中选择酵母膏作为唯一氮源。

酵母膏的主要作用是补充氮源和提供碱基类生长因子^[20]。进一步对酵母膏浓度进行优化，随着酵母膏添加量的升高，生物量呈现出一直上升的趋势，琼胶酶活力则呈现先上升后下降的趋势。添加 10 g/L 酵母膏时，生物量最大达到 4.24。在添加 6 g/L 酵母膏时，酶活力最大，在此条件下的酶活力与生物量分别为 2.51 U/mL 和 2.96（见图 4c）。因此，确定酵母膏最适质量浓度为 6 g/L。

2.3.3 NaCl 对琼胶酶产量的影响

NaCl 浓度过低不能满足菌株对生长环境要求，浓度过高又会抑制细胞生长，造成菌体产酶能力

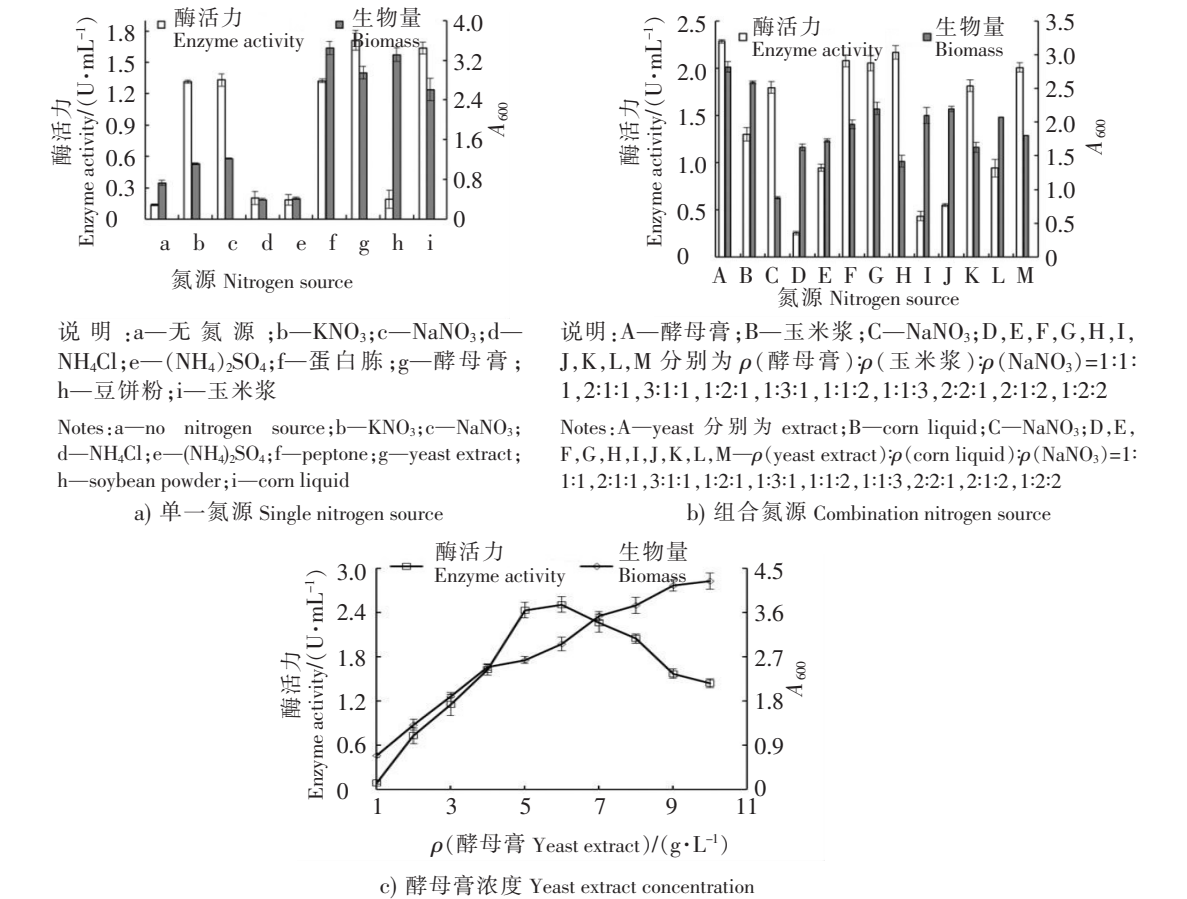


图 4 不同氮源种类及酵母膏浓度对海洋弧菌 NTi 生长及琼胶酶产量的影响
Fig.4 Effects of different nitrogen sources and concentration of yeast extract on cell growth and agarases production of *Vibrio natriegens* NTi

下降^[21]。所以, 考察发酵培养基中 NaCl 的添加量是培养基优化的重要内容之一。由图 5 可以看出, 在 NaCl 添加量为 10 g/L 时生物量达到最高为 4.22; 20 g/L 时, 最有利于菌体产酶。所以确定 NaCl 添加量为 20 g/L。

2.3.4 验证试验

通过以上试验, 初步优化得到了 *V. natriegens* NTi 发酵产琼胶酶的最佳培养基组成为(g/L): 琼脂 3, 酵母膏 6, NaCl 20, MgSO₄ · 7H₂O 5, KCl 1, CaCl₂ 0.2, K₂ HPO₄ 0.1, FeSO₄ · 7H₂O 0.02。在此条件下进行验证试验, 结果如图 6 所示。*V. natriegens* NTi 在优化后的培养基中培养 24 h 后, 琼胶酶活力与菌体生物量均有显著提高, 琼胶酶活力达到 2.52 U/mL, 生物量达到 4.04, 分别比初始培养基提高了 196% 和 350%。

2.4 发酵条件的单因素优化

2.4.1 培养基初始 pH 值及接种量对琼胶酶产量的影响

不同培养基初始 pH 值影响发酵产酶, 海水的 pH = 7.2 ~ 8.3, 海洋细菌最适宜生长的 pH 值与海水的 pH 值关系密切^[22]。从图 7a 可以看出, 该菌株的 pH 值适应范围较宽, 在 pH 值为 6.5 时, 酶活

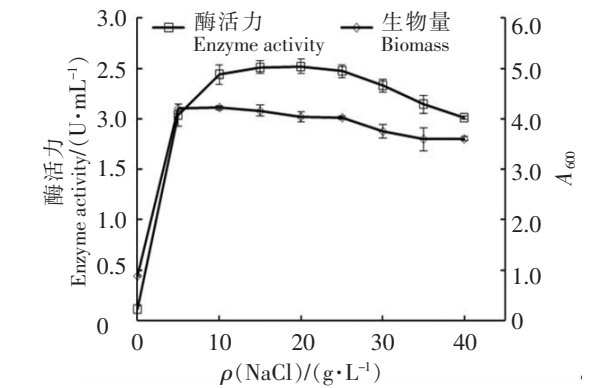


图 5 NaCl 浓度对海洋弧菌 NTi 生长及琼胶酶产量的影响
Fig.5 Effects of different NaCl concentration on cell growth and agarases production of *Vibrio natriegens* NTi

力最大值达到 1.89 U/mL，该菌株在酸性条件下产酶能力高于在中性及碱性条件下。因此，确定发酵产琼胶酶培养基最适初始 pH 值为 6.5。

由图 7b 可见，生物量在接种量 0.01% ~ 2% 的范围内没有明显变化，继续增大接种量，生物量上升但酶活力下降，当接种量为 2% 时，发酵产酶酶活力最高达到 2.06 U/mL。此后试验中，接种量选择为 2%。

2.4.2 装液量及温度对琼胶酶产量的影响

由图 8a 可以看出，当装液量为 30 mL 时，酶活力最大值达到 2.31 U/mL，在 10 ~ 110 mL 装液量范围内，生物量没有明显变化。所以，选择在 250 mL 摇瓶中装液量为 30 mL 作为最佳的装液量。考虑到海洋细菌一般选择在 20 ~ 40 ℃ 范围内培养^[9]，适宜的温度可以使菌体的生长代谢正常进行，促进产酶。由图 8b 可以看出，在 25 ℃ 下，两者同时达到最大值，生物量达到 4.25，琼胶酶活力达到 2.51 U/mL。

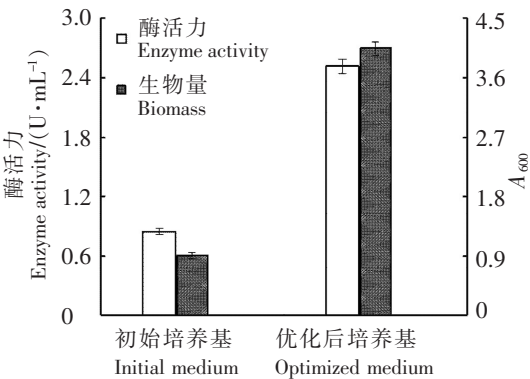


图 6 初始培养基与优化后培养基的发酵结果比较
Fig.6 Comparisons of fermentation results between initial medium and optimized medium

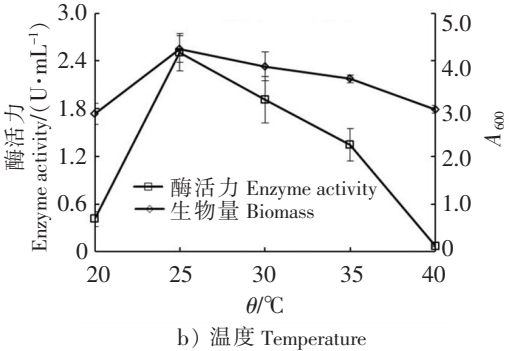
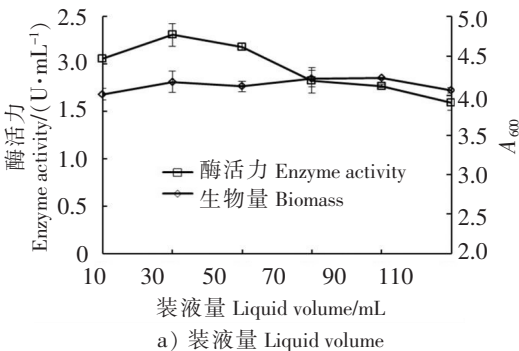
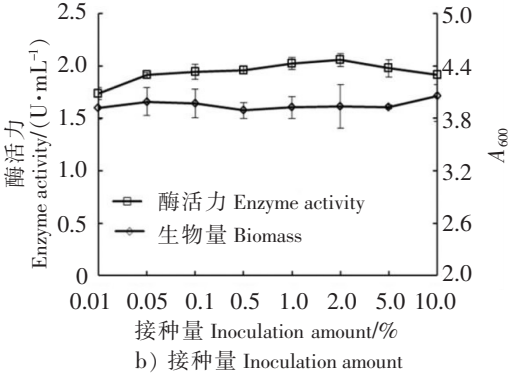
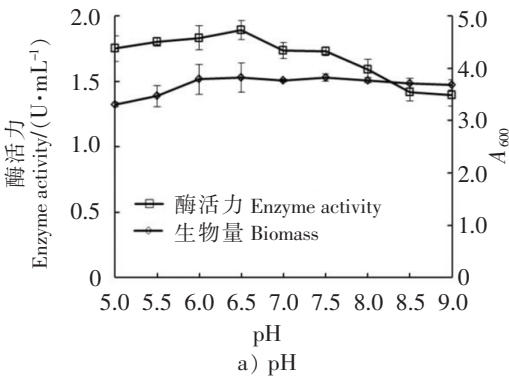


图 8 装液量及温度对海洋弧菌 NTi 生长及琼胶酶产量的影响

Fig.8 Effects of different liquid volume and fermentation temperature on cell growth and agarases production of *Vibrio natriegens* NTi

2.4.3 验证试验

通过以上试验，初步优化得到了海洋弧菌 NTi 产琼胶酶的发酵条件：培养基初始 pH = 6.5、装液量为 30 mL、接种量为 2%、发酵温度为 25 ℃。在此条件下进行验证试验，结果如图 9 所示。在优化后的发酵条件下琼胶酶活力与菌体生物量均有提高，琼胶酶活力达到 2.51 U/mL，生物量达到 4.25，分别比初始条件提高了 45% 和 10%。

2.5 海洋弧菌 NTi 发酵产琼胶酶的响应面优化

综合单因素实验结果, 选出显著影响的变量因素琼脂浓度 ($P = 0.011$)、酵母膏浓度 ($P = 0.002$)、装液量 ($P = 0.002$)、发酵温度 ($P < 0.0001$) 用于响应面设计。通过 Design-Expert 8.0 响应面设计分析软件设计了四因素三水平共 29 个实验点, 具体实验安排及结果见表 2。29 个实验点包含有 24 个析因点, 另有 5 个零点, 即作为模型的中心点, 重复 5 次以估算误差。

根据表 2 的结果, 利用分析软件对结果进行回归分析, 以琼胶酶活力 Y 为响应值, 得到多元回归拟合模型: $Y = 2.63 + 0.11A + 0.40B + 0.62C + 0.69D + 0.28AB - 0.054AC + 0.091AD - 0.037BC + 0.040BD - 10^{-3}CD - 0.34A^2 - 0.40B^2 - 0.23C^2 - 0.98D^2$ 。回归模型方差分析结果见表 3,

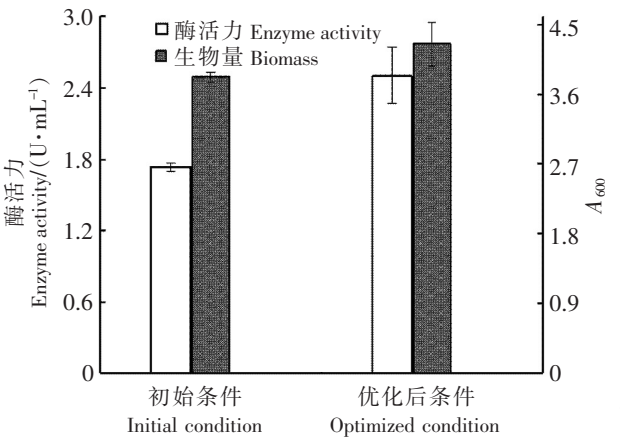


图 9 初始条件与优化后条件的发酵结果比较
Fig.9 Comparisons of fermentation results between initial condition and optimized condition

表 2 Box-Bohnkon 实验设计表及结果
Tab.2 Experimental design of Box-Bohnkon

Run	A	B	C	D	酶活力 Enzyme activity/(U · mL ⁻¹)
1	0	0	0	0	2.511
2	1	0	0	1	2.163
3	-1	0	0	-1	0.621
4	0	0	1	-1	0.654
5	1	0	1	0	2.260
6	0	0	0	0	2.690
7	0	-1	0	1	1.733
8	1	0	0	-1	0.675
9	0	-1	0	-1	0.601
10	0	-1	1	0	2.159
11	0	1	1	0	2.146
12	0	0	0	0	2.601
13	0	0	0	0	2.630
14	0	0	-1	-1	0.671
15	0	1	-1	0	1.906
16	0	-1	-1	0	1.770
17	-1	0	0	1	1.744
18	1	0	-1	0	2.293
19	0	0	0	0	2.739
20	0	1	0	-1	0.611
21	0	0	1	1	2.274
22	-1	0	-1	0	1.691
23	0	0	-1	1	2.295
24	-1	0	1	0	1.872
25	1	1	0	0	2.248
26	1	-1	0	0	1.595
27	0	1	0	1	1.904
28	-1	-1	0	0	2.214
29	-1	1	0	0	1.737

表 3 回归模型的方差分析
Tab.3 ANOVA of regression model

来源 Source	自由度 DF	离均差平方和 SS	均方 MS	<i>F</i>	Prob > <i>F</i>
模型 Model	14	12.99	0.93	35.33	0.0001
失拟 Lack of fit	10	0.34	0.034	4.44	0.0820
误差 Error	4	0.030	0.0075	$R^2 = 0.9725$	
总计 Total	28	13.35			

可见，模型的“Prob > *F*”为 0.0001，说明该模型高度显著。决定系数 $R^2 = 0.9725$ ，说明仅有约不到 3% 的琼胶酶活力变异不能用该模型解释，失拟项为 0.0820，失拟不显著，说明方程拟合充分，预测值与实验值之间有较高相关度^[23]，所以可用该回归方程代替真实试验点结果进行分析。对响应面试验进行方差分析，结果见表 4。

表 4 回归方程中各项系数及显著性检验表

Tab.4 Significant test and coefficient of regression equation

项 Term	估计 Estimate	<i>F</i>	Prob > <i>F</i>
A	0.110	5.83	0.0300
B	0.040	0.73	0.4069
C	0.062	1.73	0.2091
D	0.069	217.61	0.0001
AB	0.280	12.16	0.0036
AC	-0.054	0.44	0.5197
AD	0.091	1.27	0.2790
BC	-0.037	0.21	0.6527
BD	0.040	0.25	0.6270
CD	-10^{-3}	0.000 15	0.9903
A ²	-0.340	28.20	0.0001
B ²	-0.400	39.33	0.0001
C ²	-0.230	12.85	0.0030
D ²	-0.980	239.09	0.0001

由表 4 可以看出，一次项 A($P = 0.0300$) 对结果有显著影响，D($P = 0.0001$) 对结果具有极显著影响，B($P = 0.4069$)、C($P = 0.2091$) 则不显著；二次项中 A²($P = 0.0001$)、B²($P = 0.0001$)、C²($P = 0.0030$) 和 D²($P = 0.0001$) 都对结果有极显著影响；交互项中 AB($P = 0.0030$) 交互作用显著，其余交互项均不显著，表明实验因子对响应值都不是简单的线性关系，二次项和交互项与响应值都有很大的关系。

等高线的形状可以反映出两因素交互效应的强弱^[24]。由响应面回归分析和回归方程拟合绘制响应面图形如图 10。图 10a 是以琼脂浓度和酵母膏浓度为变量生成的响应面图，AB 图形轮廓呈现椭圆形，结合结果分析 AB($P = 0.0030$)，可见琼脂浓度与酵母膏浓度之间交互作用显著。

图 10b 展现了琼脂浓度与装液量之间的相互作用，随着琼脂浓度和装液量的不断增大，琼胶酶活力出现先上升后下降的趋势，当琼脂质量浓度在 3.3 g/L、装液量在 32 mL 附近时，琼胶酶活力达到最大。图 10c 显示了琼脂浓度与温度之间的相互作用，可以反映出温度对结果的影响比琼脂浓度更加显著，表现在响应面图形的曲面变化幅度更大。图 10d 所示是装液量与酵母膏浓度之间的相互作用，两者没有显著的交互作用，酵母膏对结果影响比装液量大。由图 10e 可以看出，当酵母膏在 6.33 g/L、温度在 27 ℃ 附近时，琼胶酶活力最高。由图 10f 可以看出，温度对结果影响比装液量要大，两者没有显著的交互作用。

通过 Design-Expert 8.0 对二次多项式模型进行求导，确定参数的最佳水平分别为 A = 0.278，B = 0.163，C = 0.087，D = 0.367，即琼脂质量浓度为 3.3 g/L、酵母膏质量浓度为 6.33 g/L、装液量为 32 mL、温度为 27 ℃，在此条件下，对最佳点进行 5 次重复实验进行优化结果验证，取平均值得到优化后的琼胶酶活力达到 2.81 U/mL，较基础培养基及培养条件下的琼胶酶活力提高了 230%。

3 结论

以实验室筛选得到的一株琼胶酶生产菌株海洋弧菌 NTi 为研究对象，以琼胶酶活力为主要指标，

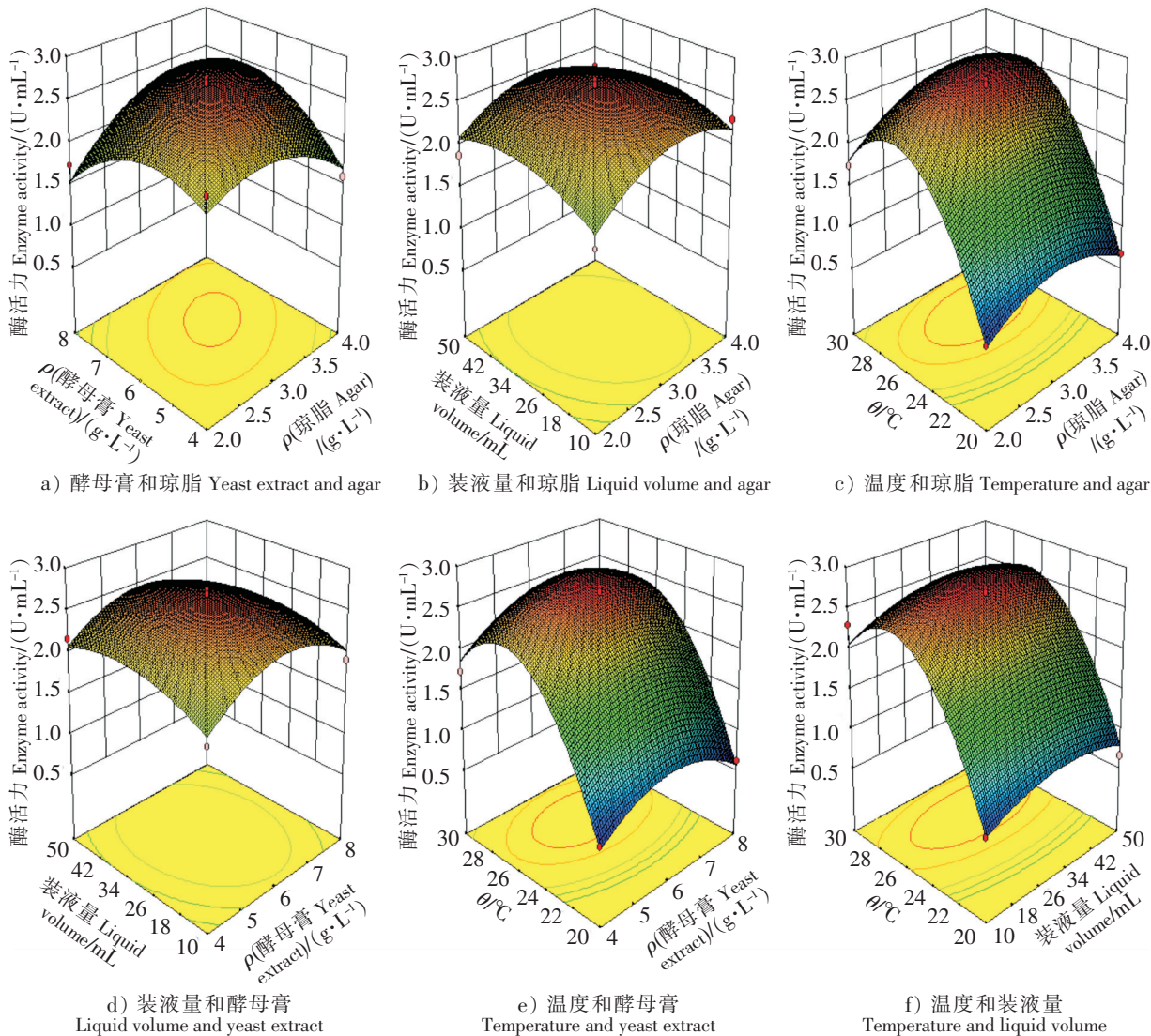


图 10 琼脂浓度、酵母膏浓度、装液量和温度对琼胶酶活力的影响

Fig.10 The 3D response surface curve of the combined effect of agar concentration, yeast extract concentration, liquid volume and temperature on agarase activity

采用单因素方法考察了琼胶酶发酵培养基的成分及发酵条件对海洋弧菌 NTi 发酵产琼胶酶生物量及酶活力的影响，并以琼胶酶活力为指标得到各个因素的最优值（g/L）：琼脂 3、酵母膏 6、NaCl 20、MgSO₄·7H₂O 5、KCl 1、CaCl₂ 0.2、K₂HPO₄ 0.1、FeSO₄·7H₂O 0.02，培养基初始 pH = 6.5、接种量 2%、装液量 30 mL、温度 25 ℃。

根据单因素实验结果，用 SPSS 19.0 对单因素实验数据进行方差分析，选出显著影响的变量因子用于响应面设计。通过响应面实验设计的方法进行四因素三水平试验。最终确定了个显著影响因子的最优值：琼脂 3.3 g/L、酵母膏 6.33 g/L、装液量 32 mL、温度 27 ℃。对发酵条件进行验证，琼胶酶活力达到 2.81 U/mL，较初始条件下的琼胶酶活力增加了 230%。在此基础上，可以进行海洋弧菌 NTi 发酵产琼胶酶小试工艺、中试放大试验及琼胶酶水解琼胶制备琼胶寡糖工艺等方面的研究。

[参考文献]

[1] CHI W J, CHANG Y K, HONG S K. Agar degradation by microorganisms and agar-degrading enzymes [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 94(4) : 917-930.

- [2] TEMUJIN U, CHI W J, CHANG Y K, et al. Identification and biochemical characterization of Sco3487 from *Streptomyces coelicolor* A3(2), an exo- and endo- type β -agarase-producing neoagarobiose [J]. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194(1): 142-149. DOI:10.1128/JB.05978-11.
- [3] 马芮萍, 朱艳冰, 倪辉, 等. 海洋细菌 NTa 发酵产琼胶酶条件的初步优化 [J]. 集美大学学报 (自然科学版), 2014, 19(4): 259-265.
- [4] ZHANG W W, SUN L. Cloning, characterization, and molecular application of a beta-agarase gene from *Vibrio* sp. strain V134 [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(9): 2825-2831.
- [5] XIAO T F, SANG M K. Agarase: review of major sources, categories, purification method, enzyme characteristics and applications [J]. *Marine Drugs*, 2010, 8(1): 200-218. DOI:10.3390/md8010200.
- [6] FU X T, PAN C H, LIN H, et al. Gene cloning, expression, and characterization of a β -agarase, AgaB34, from *Agarivorans albus* YKW-34 [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2009, 19(3): 257-264.
- [7] 牟宗娟, 李贵阳, 茅云翔, 等. 4 株琼胶降解菌的分离、鉴定及产酶条件分析 [J]. 海洋科学, 2013, 37(4): 13-20.
- [8] LIAO L, XU X W, JIANG X W, et al. Cloning, expression, and characterization of a new beta-agarase from *Vibrio* sp. strain CN41 [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(19): 7077-7079. DOI:10.1128/AEM.05364-11.
- [9] 付晓婷. 海洋细菌 (*Agarivorans albus* YKW-34) 产生的褐藻胶裂解酶及琼胶酶的研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2008.
- [10] 吴国汉. 琼胶酶生产菌的筛选、鉴定及其产酶条件的优化 [D]. 厦门: 集美大学, 2011.
- [11] JUNG C, KWON H, PARK C, et al. Optimization of *Pseudoalteromonas* sp. JYBCL 1 culture conditions, medium composition and extracellular β -agarase activity [J]. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2012, 17(5): 937-945. DOI:10.1007/s12257-012-0009-2.
- [12] 许彩云, 姚德恒, 朱艳冰, 等. 产琼胶酶菌株海洋弧菌 NTi 罐上工艺优化及中试放大 [J]. 中国食品学报, 2016, 16(11): 96-104.
- [13] MILLER G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar [J]. *Analytical Biochemistry*, 1959, 31(3): 426-428.
- [14] 王芳. 利用茶叶梗固态发酵单宁酶及其酶制剂的制备 [D]. 厦门: 集美大学, 2012.
- [15] 赵玉萍, 陈晓旺, 沈鹏伟. Box-Behnken 实验设计及响应面分析优化锰过氧化物酶培养基条件 [J]. 食品工业科技, 2013(4): 207-211.
- [16] 杨哲. 枯草芽孢杆菌产肌苷的发酵过程优化及其代谢机理分析 [D]. 厦门: 集美大学, 2013.
- [17] WANG J J, SHIH J C H. Fermentation production of keratinase from *Bacillus licheniformis* PWD-1 and a recombinant *B. subtilis* FDB-29 [J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 1999, 22(6): 608-616. DOI:10.1038/sj.jim.2900667.
- [18] 张炎达, 王凤芹, 彭一丁, 等. NH_4^+ 对合成气乙醇发酵过程的影响及其酶学机理 [J]. 食品与发酵工业, 2015, 41(12): 46-53.
- [19] 王静雪, 江晓路, 牟海津, 等. 海洋弧菌 QJH-12 发酵产琼胶酶条件的优化 [J]. 海洋科学, 2007, 31(7): 8-14.
- [20] 朱启忠, 朱慧文, 孙艳娜, 等. 海洋细菌 NBRC10260 产琼胶酶发酵条件优化 [J]. 中国酿造, 2011, 30(5): 53-55.
- [21] 王霖宁, 严孝强, 杜宗军. 琼胶酶高产海洋细菌 QM42 的发酵条件优化 [J]. 中国酿造, 2012, 31(7): 86-89.
- [22] 缪伏荣, 董志岩, 刘景. 琼胶酶产生菌 *Stenotrophomonas* sp. Z705 的发酵条件优化 [J]. 西北农林科技大学学报 (自然科学版), 2014, 42(10): 152-158, 165.
- [23] WOOD J M, BREMER E, CSONKA L N, et al. Osmosensing and osmoregulatory compatible solute accumulation by bacteria [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2001, 130(3): 437-460. DOI:10.1016/S1095-6433(01)00442-1.
- [24] 顾芮萌, 李勇昊, 田朝光. 粗糙脉孢菌 (*Neurospora crassa*) 纤维素酶液体发酵培养基的优化 [J]. 中国生物工程杂志, 2012, 32(3): 76-82.

(责任编辑 马建华 英文审校 刘静雯)